

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 07223941
PUBLICATION DATE : 22-08-95

APPLICATION DATE : 14-02-94
APPLICATION NUMBER : 06040415

APPLICANT : NIPPON HAM KK;

INVENTOR : NAKAMURA TAKESHI;

INT.CL. : A61K 31/19 A23L 1/30 A61K 31/215 A61K 31/235 A61K 31/35 A61K 31/60 A61K 31/70 A61K 35/78

TITLE : ANTICOMPLEMENTARY SUBSTANCE

ABSTRACT : PURPOSE: To obtain an anticomplementary substance composed of a specified phenolic compound and capable of remarkably inhibiting the classical activating pathway of a complementary reaction.

CONSTITUTION: This anticomplementary substance is composed of a compound selected from gallic acid, methyl gallate, acetylsalicylic acid, caffeic acid, catechin, epigallocatechin-gallate, myricetin, quercitrin, baicalein and their salts. If one or more kinds of the above compounds are used as the active component, a therapeutic agent for complement-related diseases or a health food can be prepared. The phenolic compounds have a protective effect on cells or tissues against a damage caused by a peroxidation reaction of a lipid or an enzymatic oxidation reaction in the living body and useful for prevention and therapy of collagen disease, articular rheumatism, systemic lupus erythematosus, progressive systemic sclerosis, polyarteritis nodosa, rheumatic fever dermatomyositis, allergic diseases, arterial sclerosis, hyperlipidemia, thrombosis, etc.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-223941

(43) 公開日 平成7年(1995)8月22日

(51) Int.Cl.⁶

A 6 1 K 31/19

A 2 3 L 1/30

A 6 1 K 31/215

31/235

31/35

識別記号

A B A

Z

A B C

A B F

序内整理番号

9454-4C

9454-4C

9454-4C

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-40415

(22) 出願日 平成6年(1994)2月14日

(71) 出願人 000229519

日本ハム株式会社

大阪府大阪市中央区南本町3丁目6番14号

(72) 発明者 中上 辰芳

大阪府大阪市中央区南本町3丁目6番14号 日本

ハム株式会社内

(72) 発明者 田村 竜子

大阪府大阪市中央区南本町3丁目6番14号 日本

ハム株式会社内

(72) 発明者 中村 文志

大阪府大阪市中央区南本町3丁目6番14号 日本

ハム株式会社内

(74) 代理人 弁理士 廣瀬 孝美

(54) 【発明の名称】 抗補体作用物質

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 抗補体作用物質並びにそれを含有する補体関連疾患治療剤及び保健用食品を提供することを目的とする。

【構成】 本発明の抗補体作用物質は没食酸、アセチルサリチル酸、カプルー酸、カタオン、ガラート、ミリセチン等の特定のフェノール性化合物からなる。

【効果】 当該フェノール性化合物は補体反応の古典的活性化経路を顕著に阻害作用を有する。従って、当該フェノール性化合物を有効成分として含有する本発明の補体関連疾患治療剤及び保健用食品は、補体反応により発生しないし増幅する各種の疾病の予防、治療などに極めて有用である。

3
 没食子酸メチル、サリチル酸、カフェー酸、カテキン、エビガロカテキン、ガラート、ミリセチン、ケルシトリン及びバイカリンはいずれも公知化合物であり、これらの薬理学的に許容される塩としては、例えば、アルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩など）、アルカリ土類金属塩（マグネシウム塩、カルシウム塩など）のような無機金属塩、アンモニウム塩、有機塩基塩（例えば、トリエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩など）等が挙げられる。抗補体活性に優れることから、エビガロカテキン、ガラート及びミリセチン並びにそれらの塩が特に好適に使用される。上記のフェノール性化合物は、果実、野菜、茶葉などの原料から採取された天然品を用いてもよく、また人工的に合成されたものでもよい。更に、当該フェノール性化合物を含有するものであれば、天然原料から採取した粗精製物や混合物を用いることもできる。

【0008】後記の試験例に示されるように、上記のフェノール性化合物は顕著な抗補体活性を有するので、補体系に関与する疾患の予防・治療に有用であり、更に前述のように、フェノール性化合物は、生体内で脂質の過酸化反応や酵素の酸化反応に起因する細胞や組織の障害を保護する作用を有しており、かかる作用を合わせ持つ点でより有利である。より具体的には、例えば、上記のフェノール性化合物は、ヒトをはじめとするウシ、ウマ、ブタ、ヒツジなどの哺乳動物の急性及び慢性補体関連疾患、例えば、膠原病（例えば、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、進行性全身性硬化症、結節性多発性動脈炎、リウマチ性皮膚病など）、アレルギー性疾患、動脈硬化症、高脂血症、血栓症などの予防・治療に有用であり、補体関連疾患治療、補体関連疾患の予防・治療を目的とする保健用食品などとして利用される。

【0009】本発明の補体関連疾患治療剤は、上記のフェノール性化合物の少なくとも1種を有効成分として含有するもので、当該フェノール性化合物の2種以上を含有してもよい。本発明の補体関連疾患治療剤は、経口投与又は非経口投与のいずれも採用することができる。投与に際しては、有効成分を経口投与、直腸内投与、注射等の投与方法に適した固体又は液体の医薬用無毒性担体と混合して、慣用の医薬製剤の形態で投与することができ、このような製剤としては、例えば、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等の固形剤、溶液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤、凍結乾燥製剤等が挙げられ、これらの製剤は製剤上の常套手段により調製することができる。上記の医薬用無毒性担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチル澱粉、エチレングリコール、ポリオキシエチルソルビタン脂肪酸エステル、アミノ酸、ゼラチン、アルブミン、水、生理食塩水等が挙げられる。また、必要に応じて、安定化剤、潤滑剤、乳化剤、結合剤、等張化

4
 剤等の慣用の添加剤を適宜添加することができる。本発明の補体関連疾患治療剤において、有効成分の投与量は、患者の年齢、体重、症状、疾患の程度、投与経路、投与スケジュール、製剤形態等により、適宜選択・決定されるが、例えば、経口投与の場合、一般に1日当たり0.5〜300mg/kg体重程度、好ましくは5〜100mg/kg体重程度とされ、1日数回に分けて投与してもよい。

【0010】また、本発明の保健用食品は、前記のフェノール性化合物の少なくとも1種を有効成分として含有するもので、当該フェノール性化合物の2種以上を含有してもよい。本発明の保健用食品は、そのまま、または種々の栄養分を加えて、若しくは飲食品中に含有せしめて、補体関連疾患の治療及び予防に有用な保健用食品（又は食品素材）として食される。例えば、上述した適当な助剤を添加した後、慣用の手段を用いて、食用に適した形態、例えば、顆粒状、粒状、錠剤、カプセル、ペースト等に成形して食用に供してもよく、また種々の食品（例えば、ハム、ソーセージ等の食肉加工食品、かまぼこ、ちくわ等の水産加工食品、パン、菓子、バター、粉乳、発酵乳製品など）に添加して使用されたり、水、果汁、牛乳、清涼飲料等の飲物に添加して使用してもよい。かかる保健用食品の形態における有効成分の摂取量は、患者の年齢、体重、症状、食生活、疾患の程度、食品の形態等により、適宜選択・決定され、例えば、1日当たり0.5〜300mg/kg体重程度、好ましくは5〜100mg/kg体重程度とされる。

【0011】
 【発明の効果】本発明の抗補体作用物質である前記フェノール性化合物及びその塩は、補体反応の古典的活性化経路を顕著に阻害作用を有する。従って、当該フェノール性化合物及びその塩を有効成分として含有する本発明の補体関連疾患治療剤及び保健用食品は、補体反応により発生しないし増幅する各種の疾病の予防、治療などに極めて有用である。

【0012】
 【実施例】以下、実施例及び試験例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【0013】試験例
 本発明の抗補体作用物質の効果を調べるため、補体関与溶血反応抑制試験で抗補体活性を試験した。以下、その方法及び試験結果を示す。なお、使用した材料及びその調製法は以下のとおりである。

①試験化合物：没食子酸メチル、没食子酸エチル、アセチルサリチル酸（合成品）、カフェー酸、クマリン、m-クマリン（合成品）、エビガロカテキン、ガラート、ミリセチン、ケルセチン、ケルシトリン、ルチン、バイカリン及びバイカリンは、和光純薬社製試薬を用いた。エスクレチン、エスクリン、カテキン及びエ

7

用緩衝液を用い、 $g\ pC$ 血清 (1500倍希釈) とEA (10⁴細胞/ml) とを、倍々希釈したEGCG又はミリセチンの存在下に、攪拌しながら37℃で1時間インキュベートし、5分間冷却した後、上清の吸光度 (412nm) を測定して溶血抑制率 (%) を求めた。その結果を図2に示す。図2において、AはEGCG系、Bはミリセチン系の結果を示し、横軸はEGCG又はミリセチンの濃度である。また、●—●はCa²⁺及びMg²⁺濃度が2倍、▲—▲は4倍の場合を示し、■—■はコントロール (即ち、通常の濃度) である。図2に示されるように、Ca²⁺及びMg²⁺濃度を増加させても、EGCG及びミリセチンの抗補体活性には変化がなかった。このことから、EGCG及びミリセチンの抗補体活性は、補体の古典的活性化経路に不可欠なCa²⁺及びMg²⁺に対するEGCG及びミリセチンのキレート作用に基づくものではないことが明らかになった。

【0021】試験例3

EGCG又はミリセチンで前処理したEAを用いて、EAとEGCG及びミリセチンとの相互作用を検討した。即ち、EA (10⁴細胞/ml) を、DGVVB中、37℃で10、30又は60分間の条件で、EGCG (濃度: 20 $\mu g/ml$) 又はミリセチン (濃度: 20 $\mu g/ml$) とインキュベートし、DGVVBで2回洗浄する前処理を行った。かくして得られた前処理EAを用い、実施例1と同様にして $g\ pC$ 血清とインキュベートし、溶血率 (%) を求めた。その結果を図3に示す。図3において、■—■はEGCG系を、▲—▲はミリセチン系を示し、●—●はコントロールである。図3に示されるように、20 $\mu g/ml$ の濃度で60分間の前処理を行っても、溶血は十分に抑制されなかった。前述のように、EGCG及びミリセチンのIC₅₀は約5 $\mu g/ml$ であるから、この結果から、EGCG及びミリセチンの抗補体活性は、EAに対する作用のみならず、他の因子も関与していることが推察された。

【0022】試験例4

EGCG及びミリセチンの抗補体活性に対する $g\ pC$ 血清濃度の影響を検討した。即ち、試験例1において、試験化合物としてEGCG (20 $\mu g/ml$) 及びミリセチン (20 $\mu g/ml$) を用いると共に $g\ pC$ 血清の濃度を变化させる以外に同様な方法で溶血試験を行い、溶血率 (%) を測定した。その結果を図4に示す。図4に示されるように、EGCG及びミリセチンの抗補体活性は、 $g\ pC$ 血清の濃度の増加につれて減少した。この結果から、EGCG及びミリセチンは補体成分と相互作用していることが推察された。

【0023】試験例5 (各補体成分に対する阻害作用)
補体成分C1、C4、C2及びC-E-EDTAに対するEGCG及びミリセチンの阻害効果を試験した。即ち、上記の各補体成分は、EA又は前述した適当な中間体細胞と、EGCG又はミリセチンの存在下又は不存在下に、

8

攪拌しながらインキュベートした。C1、C4及びC2については、EAC142に導き、最終的に $g\ pC$ 血清と、EDTA-GVB中、攪拌下、37℃で1時間インキュベートし、溶血率 (%) を測定し、各補体成分に対するEGCG又はミリセチンの阻害効果を評価した。その結果を図5A~Dに示す。なお、図中、四角マークはEGCG系を、丸マークはミリセチン系を示し、黒線りはヒト補体を、白抜きはモルモット補体を示す。また、横軸は、EGCG又はミリセチンの濃度を示す。図5のA~Dをより具体的に説明する。

【0024】A: EA (10⁴細胞/ml) と10単位/mlのヒト補体C1とを、EGCG又はミリセチンの存在下、30℃で10分間インキュベートし、次いで洗浄しEGCG又はミリセチンを除去した。得られたEAC1から、前述の「補体が結合したEA (中間体細胞) の調製」の項で述べた方法で、EAC142を調製した。生成したEAC142は、最終的に、70倍に希釈した $g\ pC$ 血清を等容量用いて、EDTA-GVB中、37℃、1時間の条件で溶解し、溶血率を測定した。

B: EAC1 (10⁴細胞/ml) と等容量のC4 (15.2 $\mu g/ml$) とをEGCG又はミリセチンの存在下、30℃で10分間インキュベートし、次いで洗浄しEGCG又はミリセチンを除去した。生成したEAC14の溶血率は、上記と同様に測定した。

C: EAC14 (10⁴細胞/ml) と等容量のC2 (10単位/ml) とをEGCG又はミリセチンの存在下、30℃で10分間インキュベートし、次いで洗浄しEGCG又はミリセチンを除去した。生成したEAC142の溶血率は、上記と同様に測定した。

D: EAC142 (10⁴細胞/ml) は、1600倍に希釈した $g\ pC$ 血清を等容量用いて、EGCG又はミリセチンの存在下、EDTA-GVB中、37℃、1時間の条件で溶解し、次いで溶血率を測定した。

【0025】図5に示されるように、EGCG及びミリセチンは、C-EDTA (補体成分として、C3、C5、C6、C7、C8及びC9なども含まれている) ステップに対して顕著な反応阻害効果を示した。以上の試験例1~5の結果から考察すると、本発明の抗補体作用物質は、赤血球及び補体成分のいずれにも作用して補体の古典的活性化経路を阻害していることが推察される。

【0026】実施例1

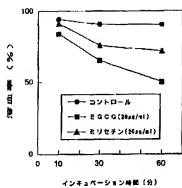
EGCG	0.5 mg
ステアリン酸マグネシウム	5 mg
コーンスターチ	20 mg
乳糖	174.5 mg

常法に準じ、上記の組成からなる混合物を、打錠成型し、錠剤を得た。

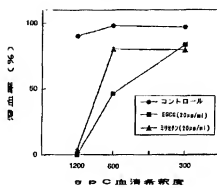
【0027】実施例2

ミリセチン	0.5 mg
ステアリン酸マグネシウム	5 mg

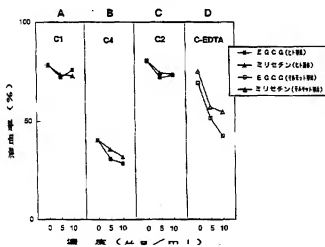
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.°

A61K 31/60

31/70

35/78

識別記号

ADN

ABX

序内整理番号

Z 8217-4C

F I

技術表示箇所